

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年12月19日

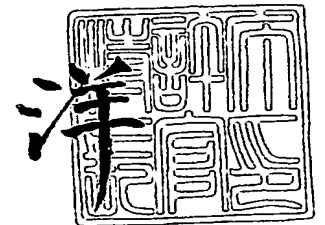
出願番号
Application Number: 特願2003-423237
[ST. 10/C]: [JP2003-423237]

出願人
Applicant(s): 財団法人神奈川科学技術アカデミー

2005年 1月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 03897
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 39/395
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 2 5 2 - 1 7 ー一ハイツ 3 0 6
【氏名】 安西 弘子
【発明者】
【住所又は居所】 東京都府中市分梅町 5 - 3 5 - 1 4 エルデ 1 0 3 号
【氏名】 中村 康司
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区東有馬 3 - 5 - 5 鷺沼南ガーデンハウス
5 0 8
【氏名】 柳内 浩之
【発明者】
【住所又は居所】 東京都練馬区立野町 3 1 - 3 3
【氏名】 宮島 篤
【特許出願人】
【識別番号】 591243103
【氏名又は名称】 財団法人神奈川科学技術アカデミー
【代理人】
【識別番号】 100088546
【弁理士】
【氏名又は名称】 谷川 英次郎
【電話番号】 03-3238-9182
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 053235
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

癌細胞表面上に発現しているDlkと抗原抗体反応する抗体であって、該癌細胞に対して抗癌作用を発揮する抗体を有効成分として含有する癌治療薬。

【請求項 2】

前記癌細胞が、肝癌細胞である請求項 1 記載の癌治療薬。

【請求項 3】

前記肝癌細胞が、肝細胞癌細胞又は胆管細胞癌細胞である請求項 1 又は 2 記載の癌治療薬。

【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の癌治療薬。

【請求項 5】

前記癌細胞がヒト細胞であり、前記抗体が抗ヒトDlk抗体である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の癌治療薬。

【請求項 6】

前記抗体は、補体の存在下において抗癌作用を発揮するものである請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の癌治療薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】癌治療薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌治療薬に関する。本発明の癌治療薬は、肝癌の治療に有効である。

【背景技術】

【0002】

日本の癌による死亡率は1980年頃から増加し、死因の第一位となっている。なかでも肝癌による死者は年間35,000人以上に上り、癌死全体の第三位である。今後、画期的な診断薬、治療薬が開発されない限り、肝癌の発症数はさらに増加すると考えられている。肝癌の治療には、外科的肝切除や経皮的エタノール注入療法、肝動脈塞栓療法などの局所療法と抗癌剤の全身投与や免疫療法などの全身的治療法が行われている。治療の主流を占めるのは局所的治療法であり、治癒度の点からみて経皮的エタノール注入療法や肝動脈塞栓療法に比べ肝切除がもっとも優れている。しかし、肝機能の障害の程度や腫瘍の占有範囲によっては手術適応とならないことも多い。全身的治療法では、標準的化学療法は確立されておらず、単剤で行った治療成績で10%以上の有効率を示したのはシスプラチンだけであり、多剤併用療法についても確立されていない（非特許文献1）。また、免疫治療では免疫賦活薬である「ピシバニール（OK-432）」（中外製薬）が肝癌に対して有効性があると報告されている。このような治療法を用いても、肝癌は多中心性発癌および再発の面から、完治が難しいのが現状であり、肝癌を特異的に攻撃する分子標的医薬品（治療抗体）の開発が重要であると考えられる。

【0003】

ここ数年、癌細胞を特異的に攻撃する分子標的医薬品の上市、開発が活発になってきている。これらの医薬品はある特定の癌に特異的に発現している標的遺伝子を狙っているため、従来の抗癌剤よりも効果が高く、かつ副作用が少ないという利点があり、今後の抗癌剤開発の主流になっていくと考えられる。癌治療抗体としては、Her2過剰発現が確認された転移性乳癌の治療薬「ハーセプチン（抗Her2ヒト化モノクローナル抗体製剤）」（中外製薬）と、CD20陽性のB細胞性非ホジキンリンパ腫の治療薬「リツキサン（抗CD20キメラモノクローナル抗体製剤）」（中外製薬、全薬工業）が製品化されている。これらの治療抗体は、抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity, CDC）活性といった生体内の免疫機構によって、癌細胞を殺傷する。癌特異的な分子標的医薬品は、現在、上市されているものは少ないが、このような癌に特異性が高い製剤が開発されれば、肝癌を含めた癌の治療率が上昇することが期待される。

【0004】

一方、本願発明者らは以前、細胞表面抗原や分泌性蛋白質をコードする遺伝子を、選択的に単離するシグナルトラップ法を用いて、マウス胎仔肝細胞に特異的に発現する遺伝子、I型膜蛋白質であるDlkを同定し、胎仔肝で高発現しているが、成体肝臓では全く発現していないことを見いだした（非特許文献2及び3）。肝臓以外にもDlkの発現は胎生期には複数の臓器、組織に認められ、出生後はほとんどの組織に見られなくなることが報告されている（非特許文献4及び5）。また、肺小細胞癌や1型神経線維腫症などの癌組織でも発現が認められている（非特許文献6及び7）。

【0005】

【非特許文献1】 Okada, S., et al (1993) Oncology. 50 (1): 22-26.

【非特許文献2】 Kitajima, T., et al (1999) Nat. Biotechnol. 17 (5): 487-490.

【非特許文献3】 Tanimizu, N., et al (2003) J. Cell Sci. 116: 1775-1786.

【非特許文献4】 Smas, C. M., et al (1993) Cell. 73 (4): 725-734.

【非特許文献5】 Floridon, C., et al (2000) Differentiation. 66 (1): 49-59.

【非特許文献6】 Jensen, C. H., et al (1999) Br. J. Dermatol. 140 (6): 1054-1059.

- 【非特許文献 7】 Herken, J. C., et al (1999) Tumour Biol. 20 (5): 256-262.
【非特許文献 8】 Russell, W. C., et al (1977) J. Gen. Virol. 36: 59-72.
【非特許文献 9】 Kipps, T. J., et al (1985) J. Exp. Med. 161: 1-17.
【非特許文献 10】 Kaneta, M. et al. (2000) J. Immunol. 164:256-264

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明の目的は、優れた抗癌効果を有する新規な癌治療薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本願発明者らは、抗ヒトDlkモノクローナル抗体を作製し、ヒト胎児および成体での発現を解析したところ、胎児では肝臓、腎臓、骨格筋での発現、成体臓器では胎盤での発現が認められた。肝癌腫瘍マーカーとして用いられているAFPは胎児肝で産生される血清蛋白であり、胎児肝臓に特異的な膜抗原や分泌蛋白質は肝細胞癌の腫瘍マーカーとなる可能性が高い。そこで、ヒト肝臓におけるDlkの発現を肝癌由来の細胞株 (JHH-6, HLF, JHH-5, Huh-6 (財) ヒューマンサイエンス振興財団より分譲) で調べたところ、FACS解析で4種類の肝癌細胞株に発現していることが確認された (特願2003-401585)。また、ヒト肝細胞癌、胆管細胞癌の病理切片を用いて免疫染色したところ、癌部でのDlkの発現が確認され、非癌部では全く染色されなかった。すなわち、胎児性抗原であるDlkは、成体の肝癌マーカーであり、抗ヒトDlkモノクローナル抗体は、上記の癌を免疫染色、フローサイトメトリーでの診断に利用できる (特願2003-401585)。

【0008】

本願発明者らは、この抗ヒトDlkモノクローナル抗体が、Dlkを発現している癌細胞を標的とした治療抗体になる可能性があることに想到した。そこで、作製した3種類の抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いて、in vitroの実験系でDlkを発現した癌細胞株を特異的に死滅させる抗腫瘍活性について検討し、抗ヒトDlkモノクローナル抗体の抗癌活性を確認し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、癌細胞表面上に発現しているDlkと抗原抗体反応する抗体であって、該癌細胞に対して抗癌作用を発揮する抗体を有効成分として含有する癌治療薬を提供する。

【発明の効果】**【0010】**

本発明により、高い抗癌作用を発揮する新規な癌治療薬が提供された。本発明の癌治療薬は、肝臓の治療に有効である。

【発明を実施するための最良の形態】**【0011】**

上記の通り、本発明の癌治療薬は、癌細胞表面上に発現しているDlkと抗原抗体反応する抗体を有効成分として含有する。Dlk自体は公知であり、DlkをコードするcDNAはクローニングされており、その塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列も公知である。例えば、ヒトDlkは、GenBank accession番号U15979およびNM_003836等々に示されている。ラットDlkは、GenBank accession番号AB046763およびD84336等々に示されている。ウシのDlkは、GenBank accession番号AB009278に示されている。マウスのDlkは、GenBank accession番号U15980及びNM_010052等々に示されている。これらのうち、GenBank accession番号U15979に示されるヒトDlkのcDNA配列及びそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号1及び2に示す。また、GenBank accession番号NM_003836に記載されている通り、Dlk cDNAには、SNPを有する複数のバリエーションが知られており、このようなバリエーションもDlkに包含されることは言うまでもない。なお、配列番号2に示すヒトDlkのアミノ酸配列のうち、細胞外領域は、24aa~304aaの領域である。

【0012】

用いる抗体としては、高くて均一な特異性を有するモノクローナル抗体が好ましい。抗マウスdlkモノクローナル抗体は公知である（非特許文献10）。また、下記実施例に具体的に記載するように、本願発明者らは、抗ヒトdlkモノクローナル抗体の作出に成功した。すなわち、ヒトdlkcDNAを哺乳動物細胞用の発現ベクターに組み込み、この組換えベクターを細胞株に導入してdlkを細胞表面上に発現する細胞株を作出し、これを免疫原として用いて常法であるKohlerとMilsteinの方法により抗ヒトdlkモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立することができる。あるいは、上記のように、dlkの細胞が領域のアミノ酸配列及びそれをコードするcDNA配列は公知であるので、dlkの細胞外領域又はその一部分は、遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により容易に調製可能である。調製したdlkの細胞外領域又はその一部分をそのまま、又はキーホールリンペックトヘモシアニン(KLH)やウシ血清アルブミン(BSA)等の担体に結合させたものを免疫原として用いる常法によっても抗dlkモノクローナル抗体を作出することが可能である。細胞表面上にDlkを発現している癌細胞に対して抗癌作用を発揮する抗dlkモノクローナル抗体は、下記実施例に具体的に記載する、Dlk発現細胞株を用いたMTTアッセイによりスクリーニングすることができる。下記実施例では、得られた3種の抗ヒトDlkモノクローナル抗体のうち2種がMTTアッセイにより抗癌作用を発揮したので、MTTアッセイによるスクリーニングにより、再現性をもって、細胞表面上にDlkを発現している癌細胞に対して抗癌作用を発揮する抗dlkモノクローナル抗体を得ることができる。

【0013】

抗体は、治療薬の投与対象の動物種と異なる動物種由来の抗体であってもよいが、少なくとも定常部が、投与対象の動物種と同一種の抗体の定常部(Fc)であることが好ましい。例えば、ヒトに投与する治療薬の場合、少なくとも定常部がヒト由来の抗体である、キメラ抗体やヒト化抗体を好ましく用いることができる。キメラ抗体やヒト化抗体を用いることにより、抗体の抗原性を減じることができ、抗体を投与した際の抗原抗体反応が起きにくくなる。のみならず、ヒトに投与する場合に抗体の定常部分をヒト由来とすることにより、ADCC活性が高くなると考えられる。すなわち、ADCCが起きるためには、エフェクター細胞のFc受容体に抗体のFcが結合することが必要であるので、Fcはその動物種のエフェクター細胞のFc受容体にフィットするものが有利であるからである。キメラ抗体は、抗原をマウスに免疫し、得られるマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部(V領域)を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体定常部(C領域)遺伝子と結合してキメラ遺伝子を作成し、このキメラ遺伝子を宿主細胞で発現させることにより得られる抗体である。その調製方法は周知であり、市販のキメラ抗体も多数存在する。また、ヒト化抗体は、マウス抗体の抗原結合部位(CDR, 相補性決定領域)の遺伝子配列だけをヒト抗体遺伝子に移植した抗体であり、キメラ抗体よりもさらにマウス由来部分が少ない抗体である。ヒト化抗体及びその調製方法も周知であり、近年、多くのヒト化抗体が市販されている。

【0014】

抗Dlk抗体は、下記実施例に具体的に記載するように、少なくとも補体の存在下で抗癌作用を発揮する。補体は、患者の血液内に含まれているので、抗Dlk抗体は、そのまま癌治療薬として機能する。なお、下記実施例では、抗ヒトDlkモノクローナル抗体のヒト肝癌細胞株に対するADCC活性は認められなかったが、これは、抗体のFcがラット由来であるためと考えられ、CDC活性が認められているので、Fcをヒト由来に変えればADCCも発揮されると考えられる。抗Dlk抗体はそのままでも用いることができるが、抗体にリシン等の毒素や他の抗癌剤を結合させることにより、いわゆるミサイル療法も可能になる。

【0015】

本発明の癌治療薬により治療される癌としては、Dlkが癌細胞表面上に発現される癌であり、肝細胞癌や胆管細胞癌のような肝癌、肺小細胞癌や1型神経線維腫症を挙げることができる。これらのうち、肝細胞癌や胆管細胞癌のような肝癌が特に好ましい。

【0016】

本発明の癌治療薬の投与経路は、患部への注射、静脈内注射、筋肉内注射等の非経口投

与が好ましい。投与量は、患者の状態や癌の進行度等に応じて適宜選択されるが、通常、成人患者1日1回、体重1kg当たり、抗体量で0.001~100mg程度、好ましくは0.01~50mg程度、さらに好ましくは0.1~5mg程度である。製剤は、単に抗体を生理緩衝液中に溶解したものであってもよいし、医薬製剤の分野において一般に用いられている1又は2以上の添加剤を添加してもよい。

【0017】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0018】

1. 材料と方法

(1) ヒトdlk 全長cDNAの単離と発現ベクターの構築

ヒトDlk(Genbank accession No. U15979)の遺伝子配列情報よりPCRプライマーを設計した。作成したプライマーの配列は以下の通りである。

フォワード側プライマー: 5'-cgcggtccgcaaccagaagccc-3'

リバーズ側プライマー: 5'-aagcttgatctcctcgctcgccggcc-3'

この時、リバーズ側プライマーにはHindIIIによる制限酵素消化配列を付加した。これらのプライマーと胎生10週のヒト肝臓より調整した全RNA (TAKARA)から合成したcDNAを鋳型としてPCR反応を行った。その後、アガロースゲル電気泳動による展開、目的のバンドの抽出を行い、pCRIIベクター(Invitrogen)にクローニングした(pCRII-hdlk)。クローニングしたヒトDlkのcDNAはシーケンスにより確認した。

【0019】

発現ベクターの構築にあたり、ヒトDlkのC末端にFlagタグを付加するため、まずpbluescript II SK(+)ベクター(STRATAGENE)のHindIII/SalI部位にFlagタグ配列をコードするオリゴヌクレオチド(配列: フォワード側5'-agcttgactacaaggacgacgatgacaagtga-3'、リバーズ側5'-tcgactcacttgatcatcgctccttgtagtca-3')を挿入した(pBS-Flag)。次にpCRII-hdlkからヒトdlk遺伝子を含むEcoRI/HindIII断片を切り出し、pBS-FlagベクターのEcoRI/HindIII部位に挿入した(pBS-hdlk-Flag)。さらにpBS-hdlk-FlagからEcoRI/SalI断片を切り出し、pcDNA3.1ベクター(Invitrogen)およびpMIGベクター8)のEcoRI/XhoI部位に挿入した(それぞれpcDNA-hdlk-Flag、pMIG-hdlk-Flag)。

【0020】

(2) ヒト肝癌由来細胞株

ヒト肝癌由来細胞株は、JHH-6、HLF、JHH-5及びHuh-6であり、いずれも(財)ヒューマンサイエンス振興財団より分譲を受けた。

【0021】

(3) 培養細胞への遺伝子導入

培養細胞への遺伝子導入は、LipofectAMINE-plus試薬(GIBCO BRL)を用い、添付のプロトコルに従って行った。

【0022】

(4) RT-PCR

ヒト肝癌由来細胞株からTrizol試薬(ニッポンジーン)を用いてRNAを抽出した。First-strand cDNA synthesis kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて抽出したRNAからcDNAを合成した後、PCR法によりヒトDlkの発現を解析した。使用したプライマーは以下の通りである。

フォワード側プライマー: 5'-agagctcaacaagaaaacc-3'

リバーズ側プライマー: 5'-gcgtatagtaagctctgagg-3'

【0023】

(5) ノーザンプロット解析

胎児組織全RNA(TAKARA)および細胞からTrizol試薬(ニッポンジーン)を用いて抽出した全RNA、各10μgをホルムアルデヒド変性ゲルにて電気泳動した。ナイロン膜に転写した

後、DIGラベルしたcDNAプローブを用いてハイブリダイズした。プローブの検出は、CDP-starを基質とした化学発光により行った。

【0024】

【0024】
(6) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体の作製

(6) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体の作製
ヒトdlk遺伝子を組み込んだ、上記レトロウイルスベクター(pMIG-hdlk-Flag)をパッケージング細胞であるBOSC23細胞 (Pear, W.S. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 90, 8392-8396) に導入し、ヒトdlk遺伝子を持つレトロウイルスを産生した。我々が以前、温度感受性SV40 large T antigenのトランスジェニックマウス (Yanai, N. et al. (1991) Exp. Cell Res. 197, 50-56) の胎児肝臓から樹立した細胞株7E2-Cに産生したレトロウイルスを感染させ、恒常的にヒトDlkを発現する細胞株7E2-C(hdlk)を得た。

【 0 0 2 5 】

【0025】
さらに、HEK293細胞（入手先：東京大学分子細胞生物学研究所機能形成）に上記発現ベクターpcDNA-hdlk-Flagを導入し、抗生物質G418(geneticin, GIBCO BRL)による選択を行った後、ヒトDlkを安定して発現している細胞株HEK293(hdlk)を樹立した。

【0026】

【0026】
抗ヒトDlkモノクローナル抗体を作製するために、2種類のDlk発現細胞株7E2-C(hd1k)とHEK293(hd1k)の細胞懸濁液を、免疫補助剤（完全フロイントアジュバンド：和光純薬工業）と1：1で混合したエマルジョンを6週齢のウイスターラットの両足に 1×10^7 細胞ずつ注射し、免疫を行った。追加免疫を2回行った後に両足のリンパ節を採取し、リンパ球を調製し、マウスのミエローマ細胞株(P3X)とポリエチレングリコール法で細胞融合を行った。96穴平底プレートでHAT（アミノプテリン、ヒポキサンチン、チミジン）を含む培地で、5% CO₂インキュベーターで培養した。培養後、増殖したハイブリドーマの培養上清を7E2-C(hd1k)株を用いたFACS解析およびCell ELISA法によりスクリーニングし、陽性クローンを選択した。このクローンをさらにクローニングし、3種類のハイブリドーマ株（クローン1C1, 4C4, 31C4）を樹立した。これらのハイブリドーマ株は、それぞれ 1.5×10^7 個/mlの濃度でRPMI培地に懸濁した。細胞懸濁液を予め7日前に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン）を投与したヌードマウス（Balb/c-nu/nuSlc）の腹腔内に200 μ L (3×10^6 個)投与した。2週間後に腹水を採取し、カプリル酸沈殿、プロテインGカラムを用いて、各抗体をアフィニティー精製した。得られた精製モノクローナル抗体は、対応する各培養上清とFACS解析において同等の活性を示した。

【0027】

(7) cell ELISA法

(7) cell ELISA法
ゼラチンでコートした96穴培養プレート(Corning)に上記7E2-C(hd1k)株を 7.5×10^3 細胞/ウェルで播種し、37℃で2日間培養した。氷冷PBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、0.2% TrironX-100 (商品名) 溶液で処理し、cell ELISA用プレートとした。以後、定法に従いELISA法を行った。

【0028】

(8) 免疫組織染色法

(8) 免疫組織染色法
ヒト正常組織、肝癌組織のパラフィン切片(Bio Chain, Hepatocellular carcinoma; catalog No.:T2235149-4, lot No.:A607070, Cholangiocellular carcinoma; catalog No.:T2235149-2, lot No.:A603549)は、脱パラフィン処理後、10mMクエン酸ナトリウム溶液中で10分間加熱処理し、抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いた染色に使用した。DAB(3,3'-ジアミノベンチジン)を基質として発色反応を行った後、対比染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。これらの操作はより具体的には次のようにして行なった。4%パラホルムアルデヒドによる固定及びパラフィン包埋された切片を、脱パラフィン処理後、10mMクエン酸ナトリウム溶液中で10分間加熱処理した。次にメタノールに終濃度0.3%となるように過酸化水素水を加えた溶液によって、室温で20分間処理し内因性のペルオキシダーゼ活性を除いた。PBSで室温5分間の洗いを2回行い、ブロックエース試薬(大日本製薬株式会社)を用いて30分間ブロッキングを行い、組織中の非特異的結合部位をふさぐ操作を行った。次に1/10に希釈したブロックエース試薬により希釈した抗ヒト

dlkモノクローナル抗体clone 1C1 (終濃度 $0.25\mu\text{g/ml}$) を室温で1時間反応させ、PBSで5分の洗いを3回行い、続いて1/10に希釈したブロックエース試薬によって100倍に希釈したビオチン化抗ラットIgG抗体を室温で1時間反応させた。PBSによる5分間の洗いを3回行った後、ABCキットの試薬を説明書通りに混ぜてABCコンプレックスを作り、これを室温で30分反応させた。PBSで5分間3回の洗いの後、ペルオキシダーゼ基質 (0.02% DAB、 0.03% 過酸化水素水、 50mM Tris-HCl pH 7.5) によって発色を行った。発色を確認した後、水で10分間洗い、マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光薬品) によって核を染色し、その後アルコールで脱水し、キシレンで透徹して、エンテランキュー (メルク・ジャパン株式会社) で封入した。

【0029】

(9) FACS解析

細胞はトリプシン処理によって培養皿より剥がし、細胞懸濁液 (細胞密度 5×10^6 cells/ml) を調製した。抗ヒトDlkモノクローナル抗体 $0.5\mu\text{g}$ と細胞懸濁液 $100\mu\text{L}$ を 4°C 、30分間反応させた。PBSで洗浄後、ビオチン化抗ラットIgG (Vector) ($0.5\mu\text{g}$) と反応 (4°C 、30分) させ、再びPBSで洗浄した。ストレプトアビジン-FITC (Pharmingen) またはストレプトアビジン-PE (Pharmingen) ($0.5\mu\text{g}$) と反応 (4°C 、30分) させた後、FACSCalibur (BECTON DICKINSON) にて解析した。

【0030】

(10) ヒト末梢血単核細胞の分離

健康人静脈血をヘパリン採血し、PBSで2倍に希釈後、Lymphoprep (第一化学薬品) 上に重層し 20°C で 800g 、20分間遠心した。遠心後、中間層分画にある単核細胞を回収し、PBSで3回洗浄後、 10% FCSを加えたDMEM培地に浮遊させエフェクター細胞として用いた。

【0031】

(11) ヒト補体血清の分離

健康人静脈血は抗凝固剤を加えずに採血し、 15ml チューブに移して 37°C の孵卵器内に60分間放置した。さらに室温に60分間放置し、血餅をチューブの壁から剥がした後に 20°C で 2500rpm 、15分間遠心した。遠心後、上清の血清を回収し、補体血清として用いた。 56°C 、30分間の加温により補体を不活性化 (非働化) した血清は、コントロールとして使用した。

【0032】

(12) MTT法

96穴プレートで培養した細胞にテトラカラーワン (生化学工業) を、添付のプロトコールに従い、各培養ウェルに添加し、 5% CO_2 インキュベーターで3-4時間反応させた。反応後96穴プレートをそのままマイクロプレートリーダーを用いて 490nm (対照波長: 655nm) の吸光度を測定した。

【0033】

(13) 補体依存性細胞傷害活性

HEK293とHEK293(hdlk)細胞はトリプシン処理によってプレートから剥離し、 10% FCSを加えたDMEM培地に $1 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で浮遊させターゲット細胞として用いた。ゼラチンコートした96穴平底プレートに $1 \times 10^4/\text{well}$ で播き、抗ヒトDlk抗体4C4、31C4およびラットIgG (それぞれ 0.2 、 1.0 、 $5\mu\text{g/ml}$) の存在下で30分培養した。さらに補体として使用するヒト血清を培養液の 25% になるように加え、72時間培養した。培養後、MTT法により吸光度を測定した。CDC活性における生細胞数を示す吸光度の値は、対照として作製した、培地に補体血清を添加したウェルの平均値を差し引いて算出した。有意差検定はStudent's t testにより行った。

【0034】

(14) 抗体依存性細胞傷害活性

HEK293とHEK293(hdlk)細胞はトリプシン処理によってプレートから剥離し、 10% FCSを加えたDMEM培地に $2 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で浮遊させ、ターゲット細胞として用いた。ゼラチンコートした96穴平底プレートに $1 \times 10^4/\text{well}$ で播き、抗ヒトDlk抗体1C1、4C4、31C4およびラ

ットIgG (5 μ g/ml)の存在下で30分培養した。さらにエフェクター細胞は、エフェクター:ターゲット比(20:1、10:1、5:1)でターゲット細胞に加え5% CO₂インキュベーターで72時間培養した。培養後MTT法により吸光度を測定した。ADCC活性における生細胞数を示す吸光度の値は、対照として作製した培地だけのウェルの平均値を差し引いて算出した。

【0035】

2. 結果

(1) ヒト正常肝臓におけるヒトDlkの発現

本願発明者らは、以前、マウスにおいてDlkが胎生肝細胞に高発現しており、成体肝細胞には発現が見られないこと、抗マウスDlkモノクローナル抗体とMACS(Magnetic beads cell sorting)を組み合わせて用いることで、胎児肝臓から肝細胞のみを高純度で回収することができることを見出ししている(非特許文献7、特許文献1)。そこで、まずヒトにおいても同様な発現パターンを示すのか検討した。ヒト胎児肝臓全RNAサンプル(TAKARA)を用いてノーザンブロット解析を行った結果、妊娠6週目から12週目の胎児肝臓においてヒトDlkの発現が認められた(図1A)。また妊娠12週目における各臓器でのヒトDlkの発現を調べた結果、肝臓以外に腎臓、骨格筋でも発現していた(図1B)。これに対し成体組織での発現は、以前の報告にあるように、胎盤以外では検出できなかった(図1C)(非特許文献1)。しかしながら最近の報告では、FAIが下垂体(Larsen, J.B. et al. (1996) Lancet. 347, 191)、副腎(Jensen, C.H. et al. (1993) Hum. Reprod. 8, 635-641)などにも発現していることが明らかにされている。このことから、ヒトでもマウスと同様に、肝臓でのDlkの発現は胎児で見られるものの、成体肝臓では発現していないことがわかった。

【0036】

(2) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体

上記の結果を更に確認するため、本願発明者らはまず、抗ヒトDlkモノクローナル抗体(ラットIgG)を作製した。抗原として2種類のヒトDlk発現細胞を樹立し、これを抗原としてラットを免疫した。ハイブリドーマを定法に従い調整し、その後、抗原として用いた7E2-C(hdlk)株を用いたFACS解析、およびcell ELISA法により陽性クローンを選択した。さらにクローニングを行い、3種類(clone 1C1、4C4、31C4)の安定したクローンを確立した。最終的に確立したクローンの培養上清を用いてFACS解析を行った結果、確かにこれらの培養上清中にヒトDlkと特異的に反応するモノクローナル抗体が産生されていることが確認された。

【0037】

これらのクローンを、予め(7日前)2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(プリスタン)を投与されたBALB/cヌードマウスの腹腔内に3x10⁶個投与し、2週間後の腹水を採取した。さらに、この腹水からカプリル酸沈澱、プロテインGカラム精製を行うことで、各ハイブリドーマクローンが産生する抗ヒトDlkモノクローナル抗体を得た。得られた精製モノクローナル抗体は、対応する各培養上清とFACS解析において同等の活性を示した。

【0038】

得られた抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 1C1を用いて、ヒト胎児組織の免疫組織染色を行った。ノーザンブロットの結果に一致して、肝臓、腎臓、骨格筋で染色像が見られた。また、胎盤組織でも同様に染色を行った結果、絨毛の合胞体性栄養細胞において強い染色が見られた。

【0039】

(3) ヒト肝癌由来細胞株におけるヒトDlkの発現

ヒトDlkの発現は、マウスでの結果と同様、胎児の未熟な肝細胞では見られるが、成体の肝細胞では発現が認められない。本願発明者らは、ヒト肝癌におけるヒトDlkの発現の可能性を検討した。まず4種類のヒト肝癌由来細胞株(JHH-6、HLF、JHH-5、Huh-6)について、FACS解析、免疫染色およびRT-PCR法によって検討した。抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 4C4を用いてFACS解析を行った結果、未分化型の細胞株(JHH-6、HLF)ではシフトは認められなかったが、分化型の細胞株(JHH-5、Huh-6)ではヒトDlkの発現を示すシフトが見られた(図2A)。また免疫染色法の結果も同様に、分化型の細胞株では染色像が確認

された(図2B)。

【0040】

次にRT-PCR法による解析を行った。それぞれの細胞株から抽出した全RNAからcDNAを合成し、これを鋳型としてPCR反応を行った。その結果、FACS解析、免疫染色の結果と同様に、分化型の細胞株ではヒトDlkの発現が見られた。しかしながらRT-PCR法では、FACS解析、免疫染色では発現の見られなかった未分化型の細胞株でも、弱いながらヒトDlkの発現が認められた(図2C)。未分化型の細胞株における結果の相違は、ヒトDlkの検出感度の差であると考えられる。

【0041】

(4) ヒト肝癌組織におけるヒトDlkの発現

ヒト肝癌由来細胞株におけるヒトDlkの発現解析の結果は、ヒトDlkが肝癌組織においても発現している可能性を示唆している。そこでヒト肝癌組織でのヒトDlkの発現を、抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 1C1を用いて免疫組織染色法により検討した。その結果、肝細胞癌および胆管細胞癌の組織において癌部で強く染色されることが明かとなった(図3)。この時、癌部に隣接する正常組織では全く染色されなかった。このことはDlkが胎生肝細胞のみならず、成体肝細胞の癌化によっても発現することを示しており、肝癌における腫瘍マーカーになりうることを示唆された。

【0042】

なお、図2B及び図3の原図はカラー写真であり、添付の図面(白黒グレースケール)では結果は明瞭ではないかもしれないが、原図では、上記結果が明瞭に示されている。

【0043】

(5) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いた293(hdlk)細胞のFACS解析(Dlk発現量の確認)

作製した抗ヒトDlkモノクローナル抗体(クローン4C4)を用いて、HEK293細胞とHEK293(hdlk)細胞のFACS解析を行った。ヒトDlkはHEK293細胞では全く発現していなかったが、HEK293(hdlk)細胞では強く発現していることが確認された(図4)。

【0044】

(6) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いたCDC活性

Dlkがヒト癌細胞株や癌組織で発現していることは、Dlkが腫瘍マーカーになり、抗ヒトDlkモノクローナル抗体が、Dlkを発現している癌細胞を標的とした治療抗体になる可能性を示唆している。そこで、まず、抗体と補体による細胞傷害、すなわちCDC活性を測定した(図5、表1.1, 1.2)。96穴プレートにターゲット細胞として、HEK293またはHEK293(hdlk)細胞を播き、抗ヒトDlk抗体(クローン4C4, 31C4を5 μ g/mlで添加)と補体血清を加えて培養した。培養3日後、MTTアッセイによりターゲット細胞の傷害を測定した。Dlk抗体を5 μ g/mlで添加したときのHEK293(hdlk)細胞の傷害は、抗体非添加やコントロールIgG抗体を添加した系に比較し、抗ヒトDlk抗体(クローン4C4, 31C4)と補体血清を添加した系で吸光度の値が低下し、生細胞数が70-90%減少していた。また、非働化した補体血清を添加して培養した場合、5 μ g/mlの抗ヒトDlk抗体(クローン31C4)を添加した系は、抗体非添加およびコントロール抗体を添加した系と吸光度に違いはみられず、生細胞数は同等であった(図5A、表1.1)。また、Dlkを発現していないHEK293細胞に対しては、いずれの抗体も細胞傷害活性を示さなかった。

【0045】

HEK293(hdlk)細胞を顕微鏡下で観察すると、補体血清にコントロールIgG抗体を添加した系、非働化補体血清に抗ヒトDlk抗体(クローン31C4)を添加した系では、細胞がコロニーを作って増殖している形態が観察されたが、補体血清に抗ヒトDlk抗体(クローン31C4)を添加した系では、ほとんどの細胞が散在し、死滅している様に見られた。一方、Dlkを発現していないHEK293細胞では、抗ヒトDlk抗体と補体血清を添加した系でも傷害を受けた細胞は確認されなかった。

【0046】

さらに、抗ヒトDlk抗体(クローン4C4, 31C4)を0.2、1.0、5 μ g/mlで添加した時のHEK

293(hd1k)細胞のCDC活性を検討した(図5B、表1.2)。培養3日後のCDC活性をMTTアッセイによって測定すると、HEK293(hd1k)細胞の生細胞数は抗ヒトDlk抗体濃度に依存して減少し、4C4と比較して31C4に強い活性が見られることが確認された。これらの結果は作製した抗ヒトDlk抗体が、Dlk抗原を発現する細胞に対してCDC活性を有することを示している。

【0047】

【表1. 1】

セル ライン	吸光度±SE				非働化血清		
	血清						
	なし	4C4	31C4	ラットIgG	なし	31C4	ラットIgG
HEK293	1.12±0.06	1.13±0.04	1.03±0.05	1.11±0.11	1.24±0.05	1.13±0.05	1.12±0.05
HEK293 [hd1k]	0.43±0.02*	0.12±0.01*	0.04±0.00*	0.43±0.01	0.89±0.05	0.95±0.02	0.75±0.03

【0048】

【表1. 2】

抗Dlk抗体	吸光度±SE			
	抗体濃度(μg/ml)			
	なし	0.2	1.0	5.0
4C4	0.43±0.02*	0.49±0.00	0.52±0.04	0.12±0.01*
31C4	0.43±0.02*	0.48±0.02	0.33±0.00*	0.04±0.00*
ラット IgG	0.43±0.02	0.43±0.01	0.42±0.02	0.43±0.01

【0049】

【表2】

セルライ ン	エフェクター：ターゲット比=10				
	なし	1C1	4C4	31C4	ラット IgG
HEK293	0.64±0.02	0.78±0.01	0.67±0.04	0.58±0.02	0.76±0.05
HEK293[hd1k]	0.45±0.01	0.60±0.04	0.50±0.01	0.52±0.01	0.62±0.03

【0050】

(7) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いたADCC活性

次に、ヒトDlkを発現しているHEK293(hd1k)をターゲット細胞、健常人末梢血単核球をエフェクター細胞として、作製した抗ヒトDlkモノクローナル抗体のADCC活性を測定した。

【0051】

96穴プレートを使い、HEK293またはHEK293(hd1k)細胞と抗ヒトDlkモノクローナル抗体(クローン1C1, 4C4, 31C4)およびヒト末梢血単核球を合わせて培養し、3日後にMTTアッセイによって各ウェルのターゲット細胞の傷害を測定した。この時、エフェクター：ターゲット比はそれぞれ20:1, 10:1, 5:1として培養した。エフェクター：ターゲット比が、10:1の時、HEK293(hd1k)細胞は、いずれの抗ヒトDlk抗体を添加しても、抗体非添加やコントロール抗体を添加した系と同様な活性を示し、HEK293細胞とも同様な活性だった(図6、表2)。また、エフェクター：ターゲット比がそれぞれ20:1, 5:1の時でも、抗ヒ

トDlk抗体を添加した系でターゲット細胞は死滅しなかった。HEK293(hd1k)細胞の抗ヒトDlkモノクローナル抗体を介した、エフェクター細胞による傷害活性は観察されなかった。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】ヒト胎児および成体組織におけるDlkの遺伝子発現を示すノーザンブロットの結果を示す写真であり、(A) 妊娠6週目から12週目の胎児肝臓におけるDlkの遺伝子発現、(B) 胎児組織におけるDlkの遺伝子発現、(C) 成体組織におけるDlkの遺伝子発現を示す。

【図2】ヒト肝癌由来細胞株におけるDlkの発現解析の結果を示す図であり、(A) FACS解析 (B) 免疫蛍光染色 (C) RT-PCR解析の結果を示す図である。

【図3】ヒト肝癌組織におけるDlkの発現を示す写真であり、(A) 肝細胞癌組織 (B) 胆管細胞癌組織についての結果を示す。

【図4】HEK293細胞とHEK293(hd1k)細胞のFACS解析によるDlkの発現を示す図であり、点線: コントロールIgG抗体、実線: 抗ヒトDlkモノクローナル抗体、を示す。

【図5】抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いたCDC活性を示す図であり、(A) HEK293細胞およびHEK293(hd1k)細胞に、抗体 $5\mu\text{g/ml}$ 、正常ヒト血清25%を添加して3日間培養し、MTTアッセイによりCDC活性を測定し、平均値 \pm 標準誤差で示した。吸光度の値は抗体非添加の系に比べ有意差を認めた(*: $p<0.01$, $n=3$, Student's t test)。(B) HEK293(hd1k)細胞に抗体、ヒト補体血清25%を添加して3日間培養し、MTTアッセイによりCDC活性を測定し、平均値 \pm 標準誤差で示した。吸光度の値は抗体非添加の系に比べ有意差を認めた(*: $p<0.01$, $n=3$, Student's t test)。

【図6】抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いたADCC活性を示す図であり、HEK293細胞およびHEK293(hd1k)細胞に、抗体 $5\mu\text{g/ml}$ と健常人末梢血単核球を加え3日間培養し、MTTアッセイによりADCC活性を測定し、平均値 \pm 標準誤差で示した。エフェクター: ターゲット比は10:1で培養した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Therapeutic agent for cancers

<130> 03897

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1553

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1322)

<223>

<400> 1 tctaaaggag gtggagagcg caccgcagcc cgggtgcagcc cgggtgcagcc ctggctttcc 60

cctcgctgcg gcccgtgccc cctttcgcg cgcgaaccag aagcccagtg cggcgccagg 120

agccggaccc gcgcccgcac cgctcccggg accgcgaccc cggccgcccag gag atg 176
Met
1acc gcg acc gaa gcc ctc ctg cgc gtc ctc ttg ctc ctg ctg gct ttc 224
Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Arg Val Leu Leu Leu Leu Ala Phe
5 10 15ggc cac agc acc tat ggg gct gaa tgc ttc ccg gcc tgc aac ccc caa 272
Gly His Ser Thr Tyr Gly Ala Glu Cys Phe Pro Ala Cys Asn Pro Gln
20 25 30aat gga ttc tgc gag gat gac aat gtt tgc agg tgc cag cct ggc tgg 320
Asn Gly Phe Cys Glu Asp Asn Val Cys Arg Cys Gln Pro Gly Trp
35 40 45cag ggt ccc ctt tgt gac cag tgc gtg acc tct ccc ggc tgc ctt cac 368
Gln Gly Pro Leu Cys Asp Gln Cys Val Thr Ser Pro Gly Cys Leu His
50 55 60 65gga ctc tgt gga gaa ccc ggg cag tgc att tgc acc gac ggc tgg gac 416
Gly Leu Cys Gly Glu Pro Gly Gln Cys Ile Cys Thr Asp Gly Trp Asp

70	75	80	
ggg gag ctc tgt gat aga gat gtt cgg gcc tgc tcc tcg gcc ccc tgt Gly Glu Leu Cys Asp Arg Asp Val Arg Ala Cys Ser Ser Ala Pro Cys 85 90 95			464
gcc aac aac ggg acc tgc gtg agc ctg gac ggt ggc ctc tat gaa tgc Ala Asn Asn Gly Thr Cys Val Ser Leu Asp Gly Gly Leu Tyr Glu Cys 100 105 110			512
tcc tgt gcc ccc ggg tac tcg gga aag gac tgc cag aaa aag gac ggg Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Gln Lys Lys Asp Gly 115 120 125			560
ccc tgt gtg atc aac ggc tcc ccc tgc cag cac gga ggc acc tgc gtg Pro Cys Val Ile Asn Gly Ser Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys Val 130 135 140 145			608
gat gat gag ggc cgg gcc tcc cat gcc tcc tgc ctg tgc ccc cct ggc Asp Asp Glu Gly Arg Ala Ser His Ala Ser Cys Leu Cys Pro Pro Gly 150 155 160			656
ttc tca ggc aat ttc tgc gag atc gtg gcc aac agc tgc acc ccc aac Phe Ser Gly Asn Phe Cys Glu Ile Val Ala Asn Ser Cys Thr Pro Asn 165 170 175			704
cca tgc gag aac gac ggc gtc tgc act gac att ggg ggc gac ttc cgc Pro Cys Glu Asn Asp Gly Val Cys Thr Asp Ile Gly Gly Asp Phe Arg 180 185 190			752
tgc cgg tgc cca gcc ggc ttc atc gac aag acc tgc agc cgc ccg gtg Cys Arg Cys Pro Ala Gly Phe Ile Asp Lys Thr Cys Ser Arg Pro Val 195 200 205			800
acc aac tgc gcc agc agc ccg tgc cag aac ggg ggc acc tgc ctg cag Thr Asn Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu Gln 210 215 220 225			848
cac acc cag gtg agc tac gag tgt ctg tgc aag ccc gag ttc aca ggt His Thr Gln Val Ser Tyr Glu Cys Leu Cys Lys Pro Glu Phe Thr Gly 230 235 240			896
ctc acc tgt gtc aag aag cgc gcg ctg agc ccc cag cag gtc acc cgt Leu Thr Cys Val Lys Lys Arg Ala Leu Ser Pro Gln Gln Val Thr Arg 245 250 255			944
ctg ccc agc ggc tat ggg ctg gcc tac cgc ctg acc cct ggg gtg cac Leu Pro Ser Gly Tyr Gly Leu Ala Tyr Arg Leu Thr Pro Gly Val His 260 265 270			992

gag ctg ccg gtg cag cag ccg gag cac cgc atc ctg aag gtg tcc atg 1040
 Glu Leu Pro Val Gln Gln Pro Glu His Arg Ile Leu Lys Val Ser Met
 275 280 285

aaa gag ctc aac aag aaa acc cct ctc ctc acc gag ggc cag gcc atc 1088
 Lys Glu Leu Asn Lys Lys Thr Pro Leu Leu Thr Glu Gly Gln Ala Ile
 290 295 300 305

tgc ttc acc atc ctg ggc gtg ctc acc agc ctg gtg gtg ctg ggc act 1136
 Cys Phe Thr Ile Leu Gly Val Leu Thr Ser Leu Val Val Leu Gly Thr
 310 315 320

gtg ggt atc gtc ttc ctc aac aag tgc gag acc tgg gtg tcc aac ctg 1184
 Val Gly Ile Val Phe Leu Asn Lys Cys Glu Thr Trp Val Ser Asn Leu
 325 330 335

cgc tac aac cac atg ctg cgg aag aag aac ctg ctg ctt cag tac aac 1232
 Arg Tyr Asn His Met Leu Arg Lys Lys Asn Leu Leu Gln Tyr Asn
 340 345 350

agc ggg gag gac ctg gcc gtc aac atc atc ttc ccc gag aag atc gac 1280
 Ser Gly Glu Asp Leu Ala Val Asn Ile Ile Phe Pro Glu Lys Ile Asp
 355 360 365

atg acc acc ttc agc aag gag gcc ggc gac gag gag atc taa 1322
 Met Thr Thr Phe Ser Lys Glu Ala Gly Asp Glu Glu Ile
 370 375 380

gcagcgttcc cacagcccc tctagattct tggagttccg cagagcttac tatacgcggt 1382

ctgtcctaata ctttgtggtg ttcgctatct cttgtgtcaa atctggtgaa cgctacgctt 1442

acatatattg tctttgtgct gctgtgtgac aaacgcaatg caaaaacaat cctctttctc 1502

tctcttaatg catgatacag aataataata agaatttcat ctttaaata g 1553

<210> 2
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Arg Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Phe Gly His Ser Thr Tyr Gly Ala Glu Cys Phe Pro Ala Cys Asn Pro
 20 25 30

Gln Asn Gly Phe Cys Glu Asp Asp Asn Val Cys Arg Cys Gln Pro Gly
35 40 45

Trp Gln Gly Pro Leu Cys Asp Gln Cys Val Thr Ser Pro Gly Cys Leu
50 55 60

His Gly Leu Cys Gly Glu Pro Gly Gln Cys Ile Cys Thr Asp Gly Trp
65 70 75 80

Asp Gly Glu Leu Cys Asp Arg Asp Val Arg Ala Cys Ser Ser Ala Pro
85 90 95

Cys Ala Asn Asn Gly Thr Cys Val Ser Leu Asp Gly Gly Leu Tyr Glu
100 105 110

Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Gln Lys Lys Asp
115 120 125

Gly Pro Cys Val Ile Asn Gly Ser Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys
130 135 140

Val Asp Asp Glu Gly Arg Ala Ser His Ala Ser Cys Leu Cys Pro Pro
145 150 155 160

Gly Phe Ser Gly Asn Phe Cys Glu Ile Val Ala Asn Ser Cys Thr Pro
165 170 175

Asn Pro Cys Glu Asn Asp Gly Val Cys Thr Asp Ile Gly Gly Asp Phe
180 185 190

Arg Cys Arg Cys Pro Ala Gly Phe Ile Asp Lys Thr Cys Ser Arg Pro
195 200 205

Val Thr Asn Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu
210 215 220

Gln His Thr Gln Val Ser Tyr Glu Cys Leu Cys Lys Pro Glu Phe Thr
 225 230 235 240

Gly Leu Thr Cys Val Lys Lys Arg Ala Leu Ser Pro Gln Gln Val Thr
 245 250 255

Arg Leu Pro Ser Gly Tyr Gly Leu Ala Tyr Arg Leu Thr Pro Gly Val
 260 265 270

His Glu Leu Pro Val Gln Gln Pro Glu His Arg Ile Leu Lys Val Ser
 275 280 285

Met Lys Glu Leu Asn Lys Lys Thr Pro Leu Leu Thr Glu Gly Gln Ala
 290 295 300

Ile Cys Phe Thr Ile Leu Gly Val Leu Thr Ser Leu Val Val Leu Gly
 305 310 315 320

Thr Val Gly Ile Val Phe Leu Asn Lys Cys Glu Thr Trp Val Ser Asn
 325 330 335

Leu Arg Tyr Asn His Met Leu Arg Lys Lys Asn Leu Leu Leu Gln Tyr
 340 345 350

Asn Ser Gly Glu Asp Leu Ala Val Asn Ile Ile Phe Pro Glu Lys Ile
 355 360 365

Asp Met Thr Thr Phe Ser Lys Glu Ala Gly Asp Glu Glu Ile
 370 375 380

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> synthetic oligoDNA primer used for amplification of human dlk cDN
 A

<400> 3
agagctcaac aagaaaacc

19

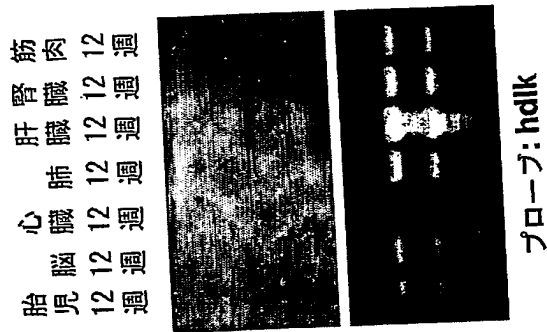
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> synthetic oligoDNA primer used for amplification of human dlk cDN
A

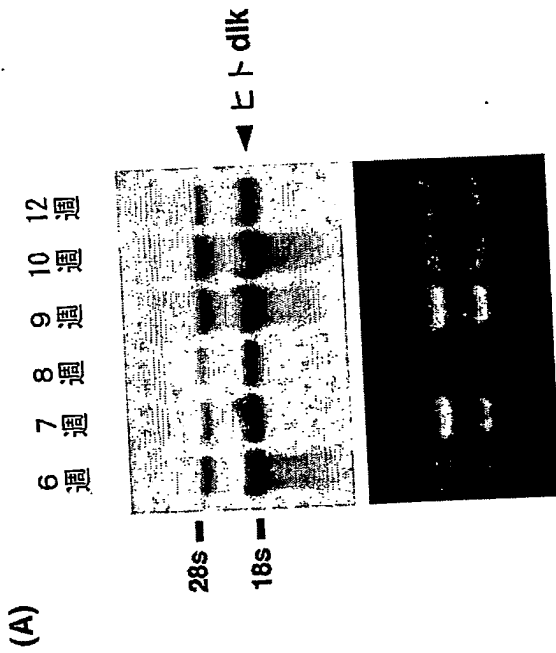
<400> 4
gcgtatagta agctctgagg

20

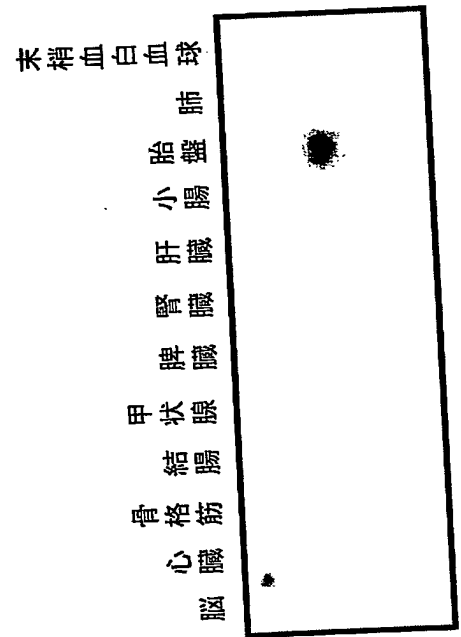
【書類名】 図面
【図 1】



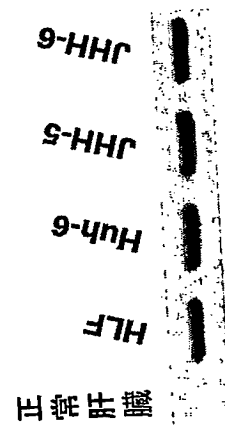
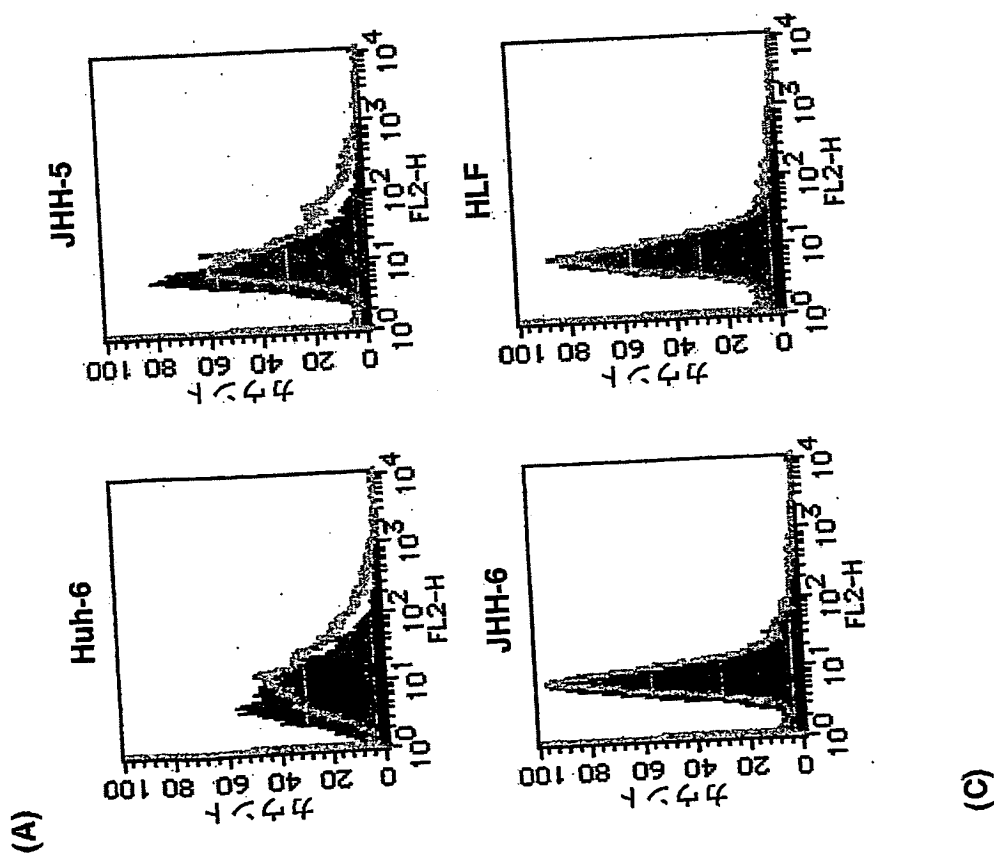
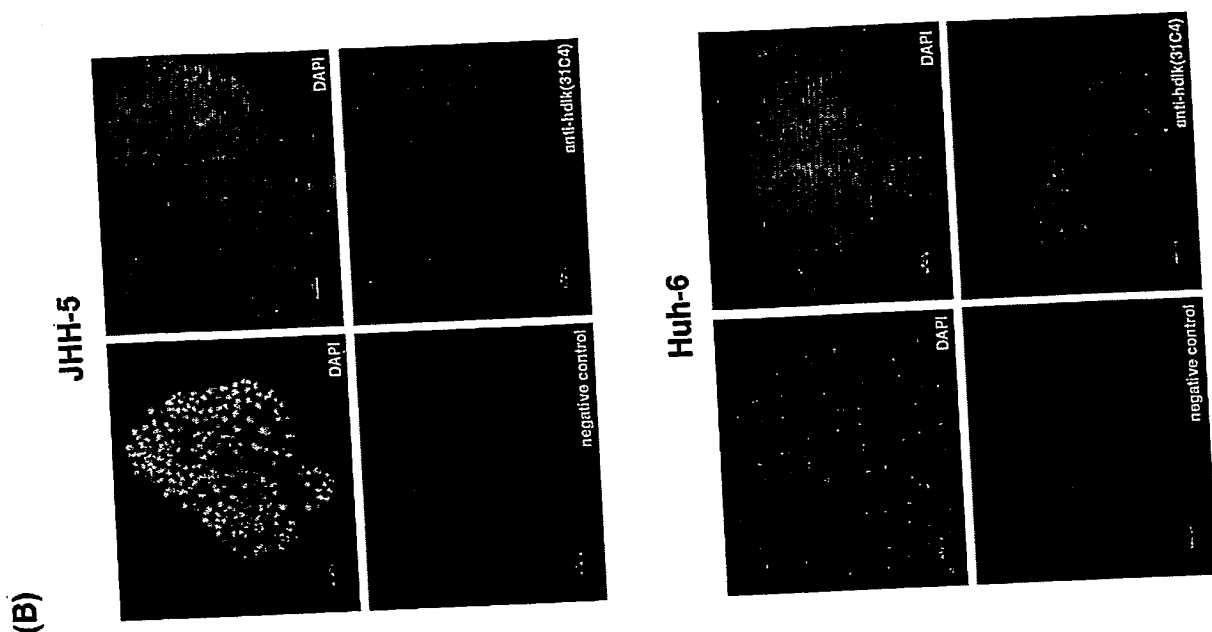
(B)



(C)



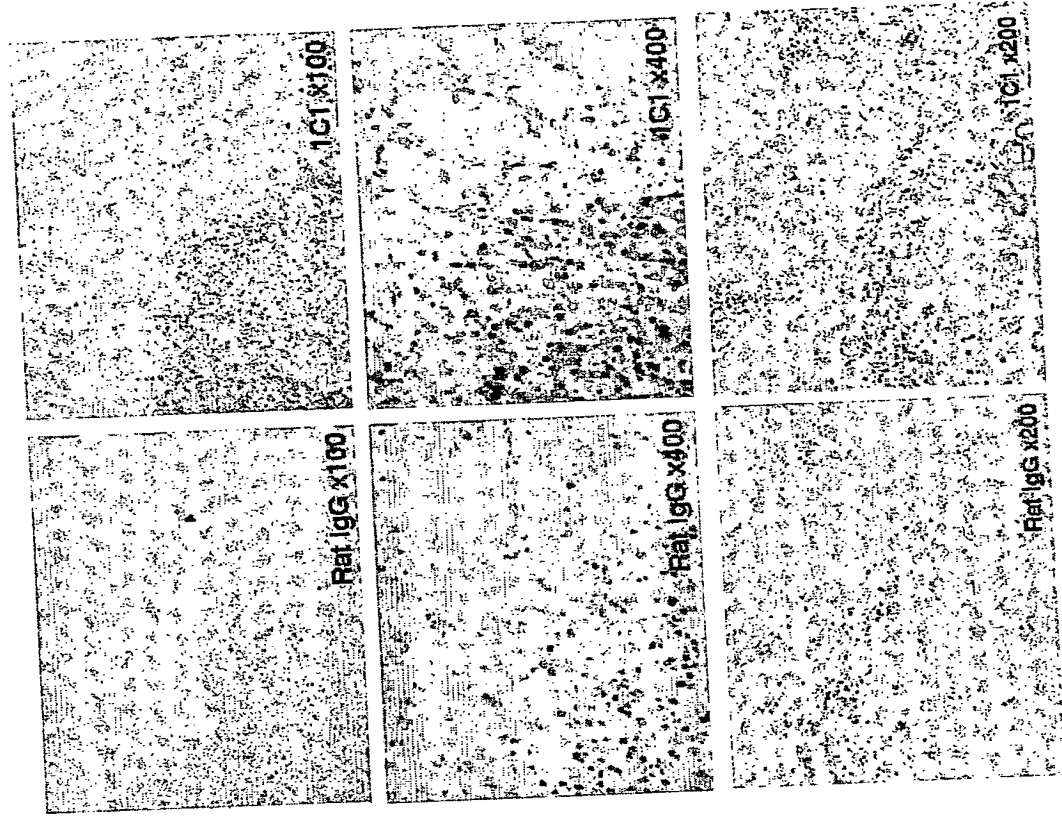
【図 2】



【図 3】

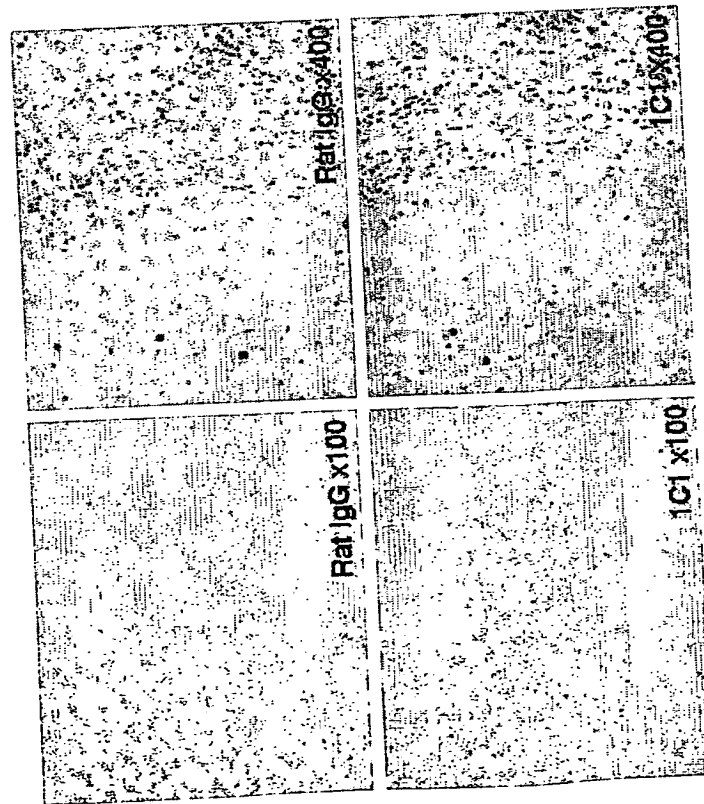
(B)

胆管細胞癌

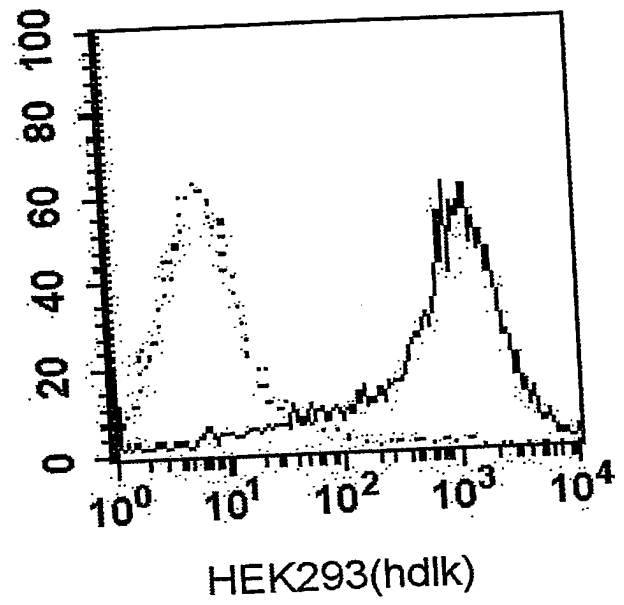
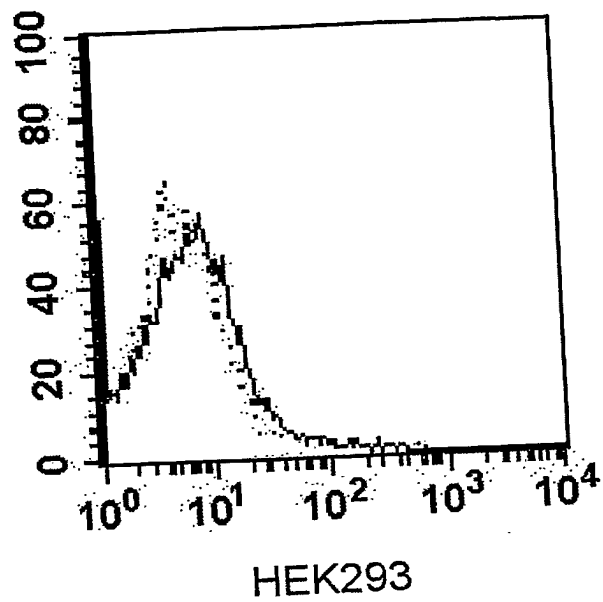


(A)

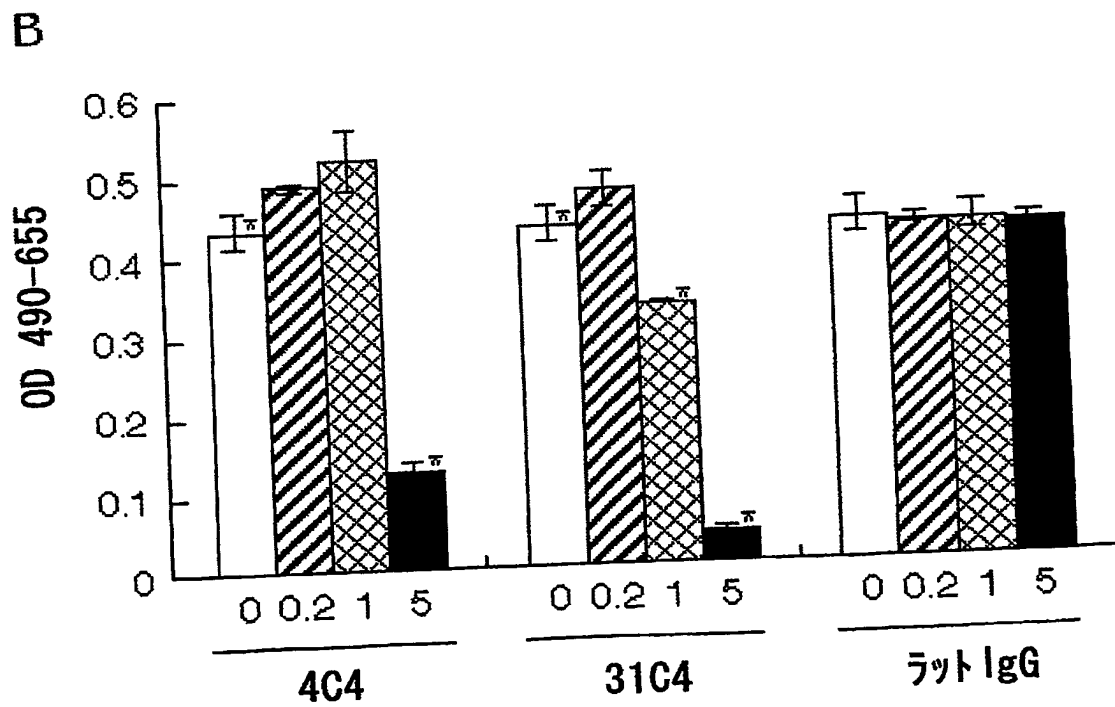
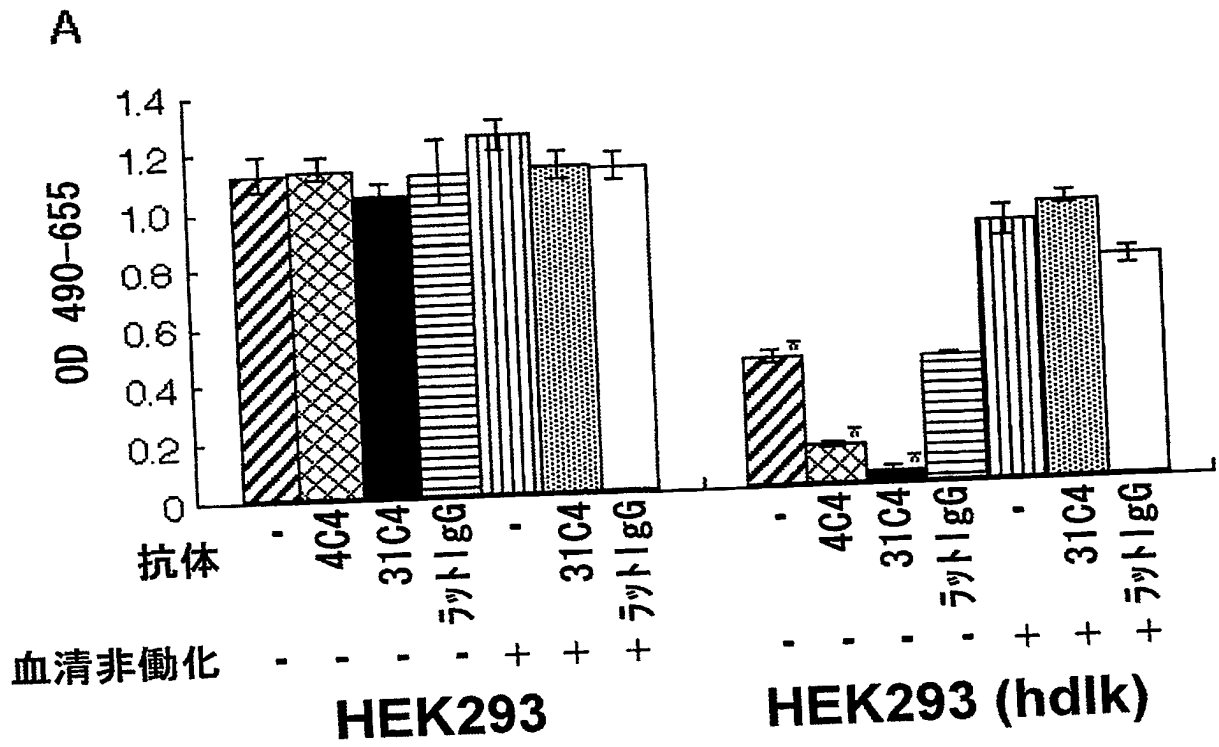
肝細胞癌

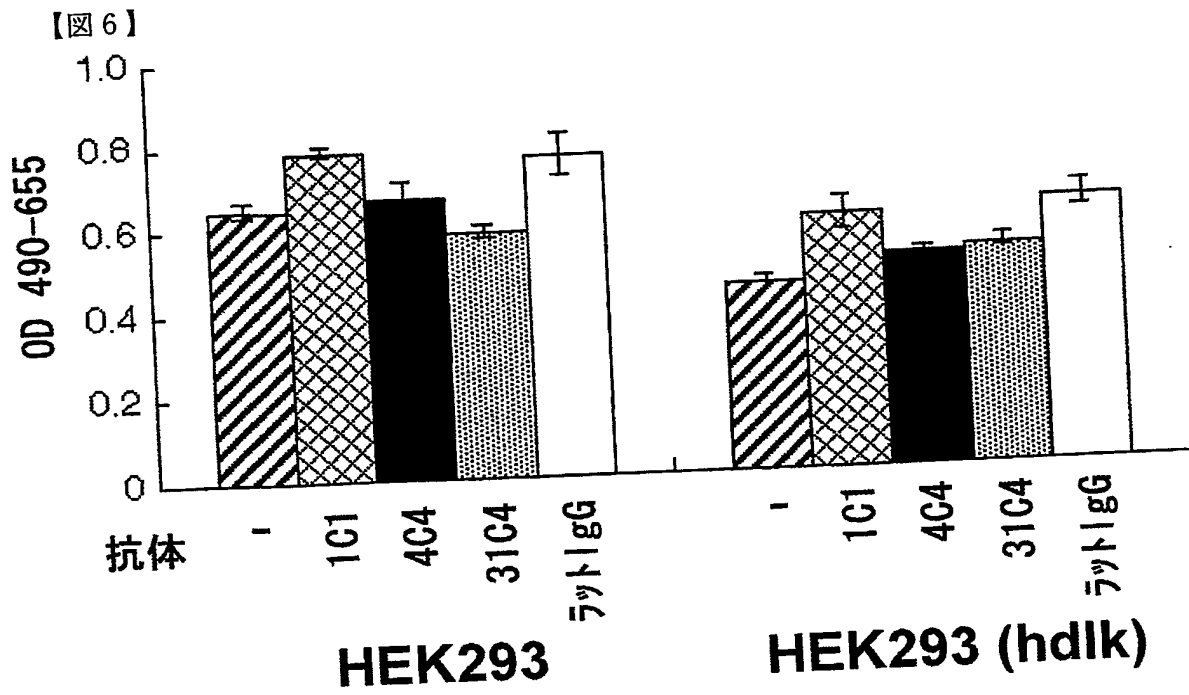


【図 4】



【図5】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた抗癌効果を有する新規な癌治療薬を提供すること。

【解決手段】 癌治療薬は、癌細胞表面上に発現しているDlkと抗原抗体反応する抗体であって、該癌細胞に対して抗癌作用を発揮する抗体を有効成分として含有する。癌細胞は、肝癌細胞であることが好ましく、特に肝細胞癌細胞又は胆管細胞癌細胞であることが好ましい。抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【効果】 本発明により、高い抗癌作用を発揮する新規な癌治療薬が提供された。本発明の癌治療薬は、肝癌の治療に有効である。

【選択図】 図 5

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-423237
受付番号	50302098528
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年12月22日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年12月19日

特願 2 0 0 3 - 4 2 3 2 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 2 4 3 1 0 3]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 5 月 1 7 日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 番 1 号

氏 名

財団法人神奈川科学技術アカデミー

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017499

International filing date: 25 November 2004 (25.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-423237
Filing date: 19 December 2003 (19.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.